

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**IZOLACE A CHARAKTERIZACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ  
Z REPRODUKČNÍCH TRAKTŮ PRASNICE A KRÁVY**

Isolation and characterization of antimicrobial peptides from reproductive tract  
of sow and cow

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Řešitel: Alžběta Pohlová

Školitel: RNDr. Jiří Liberda, Ph.D.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy Ph.D. a všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli při práci a psaní mé bakalářské práce. Zejména mému školiteli RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D za poskytnutí cenných rad, trpělivost a pomoc při psaní mé bakalářské práce. Paní prof. Marii Tiché, CSc. děkuji za ochotu poradit a za příjemné pracovní prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat kolegyním z laboratoře za příjemnou spolupráci. Zvláštní poděkování patří mé rodině a blízkým za dlouhodobou podporu, trpělivost a pochopení.

## Obsah

Poděkování .....	- 3 -
Obsah .....	- 4 -
Abstrakt .....	- 6 -
Abstrakt .....	- 7 -
<b>1 Úvod .....</b>	<b>- 8 -</b>
1.1 Samičí reprodukční trakt .....	- 8 -
1.1.1 Vaječník (ovarium) .....	- 9 -
1.1.2 Vejcovod (oviductus) .....	- 10 -
1.1.3 Děloha (uterus) .....	- 10 -
1.1.4 Pochva, poševní předsíň a vulva .....	- 11 -
1.2 Pohlavní cyklus .....	- 12 -
1.3 Oogeneze .....	- 13 -
1.4 Oplození (fertilizace) .....	- 14 -
1.5 Tekutiny reprodukčního traktu .....	- 14 -
1.6 Antimikrobiální aktivita .....	- 15 -
1.7 Cíl práce .....	- 16 -
<b>2 Materiál a metody .....</b>	<b>- 17 -</b>
2.1 Použitý materiál .....	- 17 -
2.1.1 Chemikálie .....	- 17 -
2.1.2 Biologický materiál .....	- 17 -
2.1.3 Další materiál .....	- 17 -
2.2 Metody .....	- 17 -
2.2.1 Izolace oviduktální tekutiny krávy a prasnice .....	- 17 -
2.2.2 Izolace folikulární tekutiny krávy a prasnice .....	- 17 -
2.2.3 Izolace děložní tekutiny krávy a prasnice .....	- 18 -
2.2.4 Optimalizace metody stanovení antimikrobiální aktivity na růstových křivkách buněk Escherichia coli (serotyp K-12) .....	- 18 -

2.2.5 Stanovení závislosti inhibice oviduktální tekutiny na množství buněk Escherichia coli (serotyp K-12) .....	- 20 -
<b>3 Výsledky</b> .....	- 21 -
3.1 Izolace oviduktální tekutiny krávy a prasnice .....	- 21 -
3.2 Izolace folikulární tekutiny krávy a prasnice .....	- 21 -
3.3 Izolace děložní tekutiny krávy a prasnice.....	- 21 -
3.4 Stanovení antimikrobiální aktivity na růstu buněk Escherichia coli (serotyp K-12).....	- 21 -
3.4.1 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny prasnice.....	- 22 -
3.4.2 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny krávy .....	- 23 -
3.4.3 Antimikrobiální aktivita folikulární tekutiny prasnice .....	- 24 -
3.4.4 Antimikrobiální aktivita folikulární tekutiny krávy .....	- 26 -
3.4.5 Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny prasnice .....	- 27 -
3.4.6 Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny krávy .....	- 28 -
3.5 Stanovení závislosti inhibice proteinů oviduktální tekutiny na množství buněk Escherichia coli (serotyp K-12) .....	- 29 -
3.6 Biologické aspekty výsledků .....	- 30 -
<b>4 Diskuze</b> .....	- 31 -
<b>5 Souhrn výsledků</b> .....	- 33 -
Použitá literatura.....	- 35 -

## **Abstrakt**

Z reprodukčního traktu dvou hospodářských zvířat, prasnice a krávy, byly izolovány ovidukální, folikulární a děložní tekutiny. Získané tekutiny byly lyofilizovány a použity pro stanovení antimikrobiální aktivity.

Stanovení antimikrobiální aktivity tekutin reprodukčního traktu bylo prováděno na buněčných kulturách *Escherichia coli* (serotyp K-12). Antimikrobiální aktivita byla prokázána u ovidukální, folikulární a děložní tekutiny prasnice a u ovidukální a folikulární tekutiny krávy.

Dále byla sledována inhibice růstu buněk *E. coli* (serotyp K-12), způsobená proteiny ovidukální tekutiny krávy, při různém množství buněk v kultuře.

**Klíčová slova:** ovidukální tekutina, folikulární tekutina, děložní tekutina, antimikrobiální aktivita

## **Abstrakt**

Oviductal, follicular and uterine fluid were isolated from reproductive tract of sow and cow. Obtained fluids were lyophilized and tested for potential antimicrobial activity.

Determination of antimicrobial activity was tested using cultures of *Escherichia coli* (serotype K-12). Antimicrobial activity was detected in sow oviductal, follicular and uterine fluid and in bovine oviductal and follicular fluid.

Furthermore, an inhibition of *E. coli* (serotyp K-12) cell growth was also tested, depending on the proteins of bovine oviductal fluid and the amount of *E. coli* cells in the culture.

(In Czech)

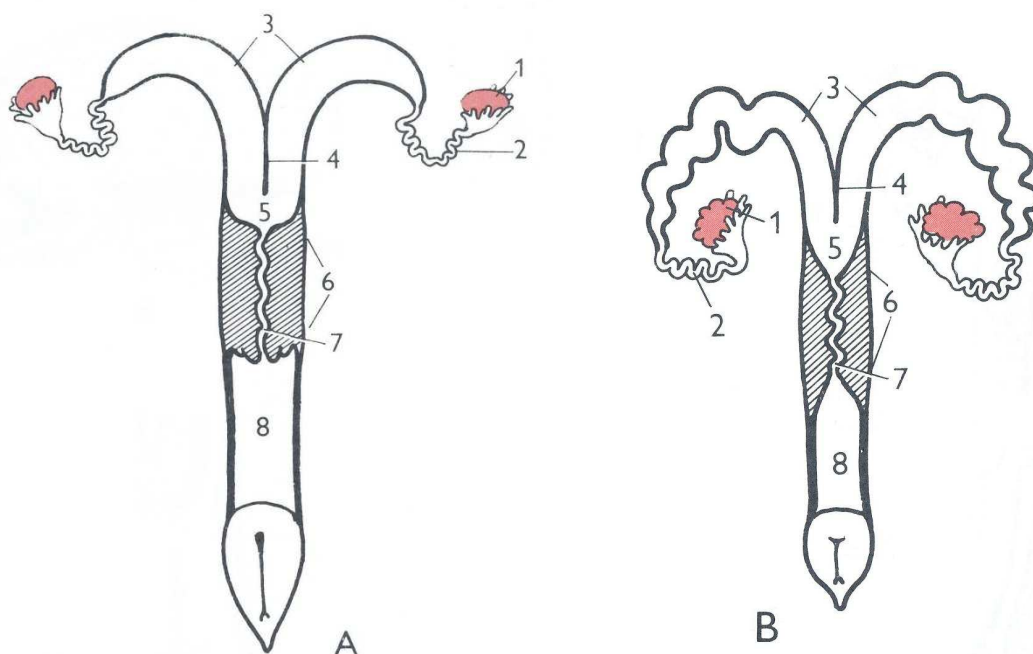
**Keywords:** oviductal fluid, follicular fluid, uterine fluid, antimicrobial activity

# 1 Úvod

Reprodukce, tedy schopnost organismu rozmnožovat se, je jeden z charakteristických znaků živých organismů a nutná podmínka pro přežití druhu. Při nepohlavním rozmnožování vzniká nový jedinec s genetickou informací stejnou jako mateřský organismus dělením nebo pučením. Při pohlavním rozmnožování živočichů splývají dvě pohlavní buňky (gamety), samčí – spermie a samičí – vajíčko, v jedinou oplozenou buňku (zygotu). Kombinací genů v zygotě se zvyšuje variabilita potomků a jejich schopnost přizpůsobit se změnám prostředí<sup>1</sup>.

## 1.1 Samičí reprodukční trakt

Samičí pohlavní orgány (*organa genitalia feminina*) vytvářejí samičí pohlavní buňky a hormony, zajišťují páření, vhodné prostředí poskytující ochranu a výživu pro vyvíjející se zárodek a plod. Schéma samičího reprodukčního traktu je vidět na Obr. 1. K pohlavním orgánům samice patří párové vaječníky a vejcovody, dvojrohá děloha, pochva, poševní předsín a vulva<sup>2,3</sup>.



**Obr. 1: Schéma pohlavního ústrojí krávy (A) a prasnice (B)** (upraveno dle <sup>3</sup>)

1 – vaječník, 2 – vejcovod, 3 – dvourohá děloha, 4 – děložní přepážka, 5 – tělo dělohy,  
6 – děložní krček, 7 – kanál děložního krčku, 8 – pochva



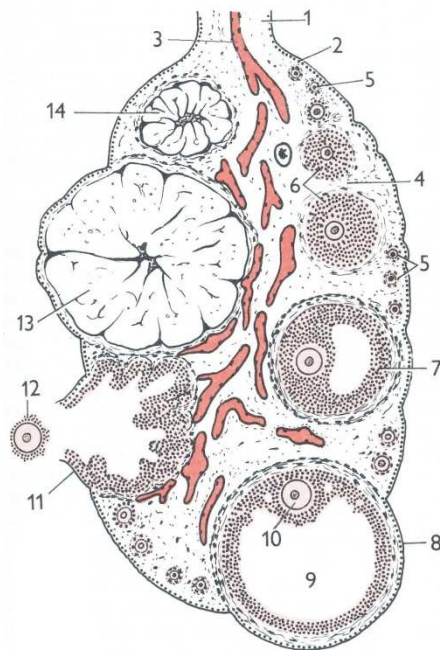
### 1.1.1 Vaječník (*ovarium*)

Vaječník je párová samičí pohlavní žláza, která vytváří samičí pohlavní buňky - vajíčka (*ovum*) a pohlavní hormony – estrogen a progesteron. Je to šedorůžový tuhoelastický orgán zavěšený na strop dutiny břišní poměrně dlouhým vaječnickovým okružím, kterým vstupují i vystupují cévy a nervy. Místo vstupu a výstupu cév a nervů nazýváme vaječnicková branka. K děložnímu rohu je vaječník připojen vlastním vaječnickovým vazem. Povrch vaječníku je tvořen epitelem, pod ním je vazivová vrstva obalující vlastní tkáň vaječníku. Tato tkáň se dělí na povrchovou korovou vrstvu s vaječnickovými váčky – folikuly, a vnitřní cévní vrstvu – dřeň, která přiléhá k vaječnickové brance a větví se v ní cévy a nervy<sup>3-5</sup>.

Vaječník dospělé krávy tvarem a velikostí připomíná švestku – oválný, na stranách mírně zploštělý. Je 3 – 4,5 cm dlouhý, 2 – 3 cm široký a jeho hmotnost je 15 – 20 g. Vzhledem k celkové hmotnosti krávy je vaječník poměrně malý. Povrch je hladký s několika hrbolky od měchýřkovitých folikulů. Většina povrchu vaječníku je volná tzv. ovulační plocha, na které praskají dozrálé vaječnickové folikuly<sup>3,4</sup>.

Vaječník prasnic je 4 – 5 cm dlouhý a váží 10 – 15 g. V důsledku velkého počtu folikulů a žlutých tělísek je jeho povrch hrbolatý<sup>3,4</sup>.

Schéma savčího vaječníku s folikuly je na Obr. 2.



**Obr. 2: Schéma savčího vaječníku (upraveno dle<sup>3)</sup>)**

1 – vaječnicková branka, 2 – epitel, 3 – krevní cévy, 4 – korová vrstva, 5 – primární folikuly, 6 – sekundární folikuly, 7 – měchýřkovitý folikul, 8 – zralý měchýřkovitý folikul, 9 – dutina folikulu, 10 – primární oocyt, 11 – prasklý Graafův folikul, 12 – uvolněný oocyt s obaly, 13 – žluté tělísko ve stádiu proliferace, 14 – žluté tělísko ve stádiu regrese

### 1.1.1.1 Folikuly

Primární folikuly jsou kulovité útvary o velikosti 30 – 50 µm uložené přímo pod obalem. Skládají se z vaječné buňky ve stadiu primárního oocyty (I. řádu) obalené jednou vrstvou folikulárních buněk, které plní funkci ochrany a vyživující. Po narození má samice v jednom vaječníku 50 – 200 tisíc primárních folikulů, ale převážná většina se dále nevyvíjí a podléhá zániku. S nástupem puberty se primární folikuly mění na sekundární folikuly – zvětšuje se vaječná buňka, množí se folikulární buňky, které několika vrstvami obalují oocyt a folikul sestupuje do vnitřních vrstev kůry. Dalším růstem folikulu vznikají mezi folikulárními buňkami mezery vyplněné tekutinou, které se postupně slévají a vytváří dutinu obsahující mok. Měchýřkovité folikuly jsou konečné stádium rostoucího folikulu. Jsou asi 1,5 – 2 cm velké, zasahují do kůry vaječníku a zároveň prorůstají až na jeho povrch. Zralý měchýřkovitý folikul (Graafův folikul) se vyklenuje nad povrch vaječníku, při ovulaci praskne a uvolní se z něj vaječná buňka s obaly. V místě prasklého folikulu vzniká žluté tělísko (*corpus luteum*), což je útvar s vnitřní sekrecí – produkuje pohlavní hormon progesteron<sup>3,6</sup>.

### 1.1.2 Vejcovod (*oviductus*)

Vejcovod je párová trubička šířky asi 0,5 cm, která spojuje vaječník s rohem dělohy. U krávy je vejcovod 20 – 30 cm dlouhý, u prasnic dosahuje délky 15 – 30 cm. Jeho stěnu tvoří sliznice s řasinkami a sekrečními buňkami, svalovina a pobřišnice. Vejcovod začíná v těsné blízkosti vaječníku nálevkou (*infundibulum*), která zachytí ovulované vajíčko. Na dně nálevky se nachází asi 2 mm široký otvor, který tvoří ústí vejcovodu do dutiny břišní. Nálevka přechází v široký úsek vejcovodu (*ampulla*), zbývající část je zúžená a klikatě zvlněná (*istmus*) a nakonec ústí do děložního rohu. Vejcovod zajišťuje prostředí, ve kterém vajíčko dokončuje svůj vývoj a dochází zde k oplození vajíčka spermií. Pomocí rytmických stahů svaloviny a kmitání řasinek se vajíčko přesunuje do dělohy<sup>2-5</sup>.

### 1.1.3 Děloha (*uterus*)

Děloha je silnostěnný dutý orgán, který slouží k vývoji nového jedince od oplozeného vajíčka až do porodu. Jak je vidět na Obr. 1 (str. 8) kráva i prasnice mají dělohu dvourohou, což znamená, že se skládá ze dvou děložních rohů, do kterých ústí vejcovody, děložního těla

a krčku. Děložní stěna je tvořena hladkou svalovinou a sliznicí s množstvím žláz, které tvoří sekret pomáhající při nidaci embrya. Stahy děložního svalstva napomáhají při transportu spermií směrem k vejcovodům a při porodu vypudí plod<sup>3,6</sup>.

Děložní rohy dospělé krávy jsou 35 – 45 cm dlouhé, u prasnic tvoří nepravidelné kličky a dosahují délky 120 – 140 cm. Děložní tělo má asi 5 cm v průřezu a spolu s rohy tvoří děložní dutinu. Mezi pochvou a tělem dělohy je umístěn děložní krček. Středem krčku prochází úzký kanál, který je uzavřený s výjimkou období říje a porodu, kdy se fyziologicky otevírá. U prasnic ústí krček nálevkovitě do pochvy, u krávy se vchlípením části krčku do pochvy vytvořil děložní čípek. Děložní krček produkuje hlen obsahující mucin, proteiny, aminokyseliny, enzymy a další organické sloučeniny. V období říje se hlen uvolňuje a umožňuje průnik spermií do dělohy. Naopak v době březosti tvoří hustý hlen zátku, která brání průniku spermií a bakterií do dělohy<sup>2,3,6</sup>.

#### **1.1.3.1 Děložní cyklus**

Pravidelné změny na děložní sliznici v průběhu pohlavního cyklu nazýváme děložní cyklus, v němž rozlišujeme tři fáze – proliferace, sekrece a regrese. V proliferační fázi (u krávy 19. – 21. den pohlavního cyklu a 1. den cyklu následujícího) narůstá epitel děložní sliznice i epitel žláz a dochází k prokrvení sliznice, které vrcholí v období říje. V sekreční fázi (2. – 12. den cyklu) produkují děložní žlázy mléčně zakalený sekret, který obsahuje glykogen, lipidy a hlen. V děloze jsou vytvořeny vhodné podmínky pro uhnízdění oplozeného vajíčka. Pokud nedošlo k oplození vajíčka, nastává fáze regrese (13. – 18. den pohlavního cyklu). Ustává sekrece děložních žláz a dochází ke snižování epitelu sliznice<sup>3</sup>.

#### **1.1.4 Pochva, poševní předsíň a vulva**

Pochva (*vagina*) je pářicí orgán samice, který je děložním krčkem spojen s dělohou. Je to široká svalová trubice vystlaná sliznicí bez žláz. V důsledku osídlení mikroorganismy se v pochvě udržuje nízké pH, což vytváří ochranu před patogeny. Pokračováním pochvy je poševní předsíň (*vestibulum vaginae*), která se navenek otevírá vulvou. Do poševní předsíně ústí močová trubice, takže předsíň slouží zároveň i jako vývodná močová cesta. Sliznice předsíně obsahuje množství žlázek, jejichž sekret zvlhčuje sliznici předsíně i pochvy, a tím chrání sliznici před poškozením močí<sup>2,6</sup>.

## 1.2 Pohlavní cyklus

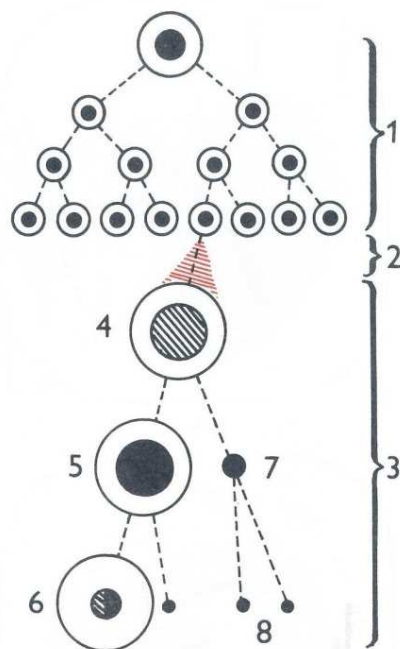
Pohlavní dospělosti prasnice dosahuje ve věku 5 – 8 měsíců a kráva mezi 8 a 12 měsícem. Při dosažení pohlavní zralosti se u samic objevují pravidelné fyziologické změny na reprodukčních orgánech a v celém organismu způsobené pohlavními hormony. Zmíněnými změnami se vytváří vhodné podmínky pro oplození vajíčka a vývoj plodu. Toto období se u zvířat nazývá říje (*estrus*), proto i cyklus nese název říjový – estrický. Kráva i prasnice patří mezi tzv. polyestrická zvířata, což znamená, že se období říje periodicky opakuje v krátkých intervalech po celý rok, konkrétně jednou za 21 dní u obou zvířat. Podle funkčních změn na pohlavních orgánech dělíme říjový cyklus na fáze – proestrus, estrus, postestrus, metestrus a diestrus<sup>3,6</sup>.

- proestrus – předříjová fáze trvá 19. – 21. den cyklu; dochází k narůstání Graafova folikulu na vaječníku; v děloze nastává proliferace a děložní sliznice narůstá
- estrus – říje je doba sexuální ochoty a zahrnuje 1. a 2. den říjového cyklu; pohlavní orgány se silně prokrvují; otevírá se kanálek děložního krčku a vytéká hustý hlenovitý sekret; po odeznění zevních příznaků dochází k ovulaci; ke konci říje se u samic objevuje svolnost k páření
- metestrus – poříjnová fáze trvá 3. – 6. den cyklu; z ovulovaného folikulu se vyvíjí žluté tělísko; děložní sliznice vstupuje do fáze sekrece; uzavírá se děložní kanál
- diestrus – meziříjová fáze; trvá 7. – 18. den cyklu; do 12. dne cyklu se zvětšuje žluté tělísko; od 12. dne cyklu pokud:
  - a) nedošlo k oplození vajíčka – žluté tělísko postupně zaniká, děložní sliznice vstupuje do fáze regrese
    - u polyestrických zvířat po diestru nastupuje proestrus
    - u monoestrických a diestrických zvířat přichází anestrus, což je dlouhé období klidu
  - b) došlo k oplození vajíčka – žluté tělísko nezaniká a diestrus přichází v březost (graviditu)

Období estrálního cyklu můžeme také rozdělit na fázi folikulární a luteální. Proestrus a estrus spadají do fáze folikulární, kdy dochází k růstu a zrání folikulů na vaječnících a trvá 3 – 6 dní. Fáze luteální je doba po ovulaci, takže zahrnuje období po prasknutí folikulu a tvorbu žlutého tělíska<sup>6</sup>.

### 1.3 Oogeneze

Oogeneze, tedy vývoj samičích pohlavních buněk, začíná už v prenatálním období v zárodku samice. Před narozením, ve fázi množení, se na vaječníku opakovaným mitotickým dělením buněk zárodečného epitelu tvoří velké množství buněk – oogonií. Tyto vaječné



**Obr. 3: Oogeneze**

- 1 – fáze množení oogonií, 2 – fáze růstu,
- 3 – fáze zrání, 4 – primární oocyt,
- 5 – sekundární oocyt, 6 – zralý oocyt,
- 7 – první pólová buňka,
- 8 – druhá pólová buňka

buňky pronikají do vaječníku a obalují se jednou vrstvou folikulárních buněk za vzniku primárních folikulů s oocytem I. řádu. Ještě před narozením samice diploidní oocyty I. řádu vstupují do prvního meiotického dělení. Vývoj primárního oocytu je přerušen v profázi I a dokončuje se až v pohlavní dospělosti samice. Při spuštění estrálního cyklu vstupuje každý cyklus několik oocytů I. řádu do fáze růstu. Vaječná buňka si ve své cytoplazmě ukládá žloutkové inkluze důležité jako zdroj energie pro vyvíjející se zárodek v prvotní fázi vývoje. Během období růstu se mění primární folikul na folikul rostoucí až Graafův. Před ovulací nastává fáze zrání, ve které oocyt dokončuje meiotické dělení z prenatálního období, čímž vzniká haploidní oocyt II. řádu a první pólové tělísko, které má jednu sadu chromozómů a malé množství cytoplazmy. Na první meiotické dělení ihned navazuje druhé meiotické dělení, které je zastaveno v metafázi a je dokončeno až po oplození vajíčka. V této fázi je vajíčko ovulováno - uvolněno z prasklého folikulu spolu s dvěma vrstvami buněk nazývanými *zona pellucida* a *cumulus oophorus*.

Po splnutí se spermií oocyt dokončí meiotické dělení a vznikne velké vajíčko (*ovum*) a druhá pólová buňka. Na Obr. 3 je vidět schéma oogeneze, při které vzniká jedno velké vajíčko a 3 malá pólová tělíska. Pólové buňky nemají schopnost vývoje, takže degenerují a zanikají. V případě, že nedošlo k oplození, zaniká i oocyt. Plného vývoje dosahuje jen malá část pohlavních buněk<sup>2,3,6</sup>.

## 1.4 Oplození (*fertilizace*)

Oplození je biologický proces, při kterém dochází ke splnutí samčí pohlavní buňky - spermie a samičí pohlavní buňky – vajíčka za vzniku oplozeného vajíčka – zygoty. Ke splnutí gamet dochází ve vejcovodu, kam je ovulované vajíčko dopraveno pomocí stahů vejcovodu a pohybu řasinek epitelu.

Ejakulovaná spermie ještě není schopná oplodnit vajíčko. Na povrchu mají spermie speciální proteiny (spermadheziny) umožňující navázání k epiteliálním buňkám v istmické části vejcovodu, vytvoří se tzv. oviduktní rezervoár<sup>7,8</sup>. Spermie v rezervoáru interagují se složkami oviduktní tekutiny, čímž dochází k metabolickým a fyziologickým změnám souhrnně nazývaným kapacitace<sup>9,10</sup>. Teprve spermie po kapacitaci je schopná uvolnit se z oviduktního rezervoáru, najít a oplodnit vajíčko. Spermie, vybavená bičíkem, se k vajíčku pohybuje aktivně pomocí termotaxe a chemotaxe<sup>11,12</sup>.

Ve folikulu vaječníku i po ovulaci je vajíčko obklopeno kumulárními buňkami (*cumulus oophorus*), které ho vyživují a chrání. Tato viskózní a elastická vrstva buněk je bohatá na kyselinu hyaluronovou<sup>13,14</sup>. Na svém povrchu má vajíčko ještě silnou blánu - *zonu pellucidu*. U myši je složena ze tří glykoproteinů (ZP1, ZP2 a ZP3), lidské vajíčko má *zonu pellucidu* složenou ze čtyř glykoproteinů (ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4)<sup>10,15</sup>.

Fertilizace začíná průnikem spermie přes obaly vajíčka. Vrstvou kumulárních buněk prochází spermie za pomoci hyaluronidasy<sup>16</sup>. Pro penetraci *zony pellucidy* je nutná akrozomální reakce. Navázáním spermie na glykoprotein ZP3 se zvýší koncentrace vápenatých iontů a zvýší se pH, což vyvolá signální kaskádu. Splnutím cytoplasmatické membrány spermie a vnější akrozomální membrány dojde k vylití lytických enzymů z akrozomu a k narušení *zony pellucidy*. Pomocí bičíku a zmíněných enzymů se spermie dostane k plasmatické membráně vajíčka a dojde k fúzi jejich membrán. Po oplození dokončí vajíčko II. meiotické dělení<sup>10, 17, 18</sup>. Po fúzi vajíčka a spermie se do perivitelinního prostoru uvolní obsah kortikálních granulí vajíčka. Dojde k modifikaci *zony pellucidy*, čímž se zabrání průniku dalších spermií do vajíčka, polyspermii<sup>19</sup>.

## 1.5 Tekutiny reprodukčního traktu

Tekutiny sekretované buňkami a žlázkami jsou nepostradatelnou součástí reprodukčního traktu savců. V prostředí těchto tekutin probíhají zásadní děje spojené s fertilizací. Vajíčko, zrající ve folikulu vaječníku, je obklopeno folikulární tekutinou

produkovanou folikulárními buňkami. Obsahuje proteiny, kyselinu hyaluronovou a steroidní hormony<sup>20,21</sup>. Funkce proteinů obsažených ve folikulární tekutině zatím nejsou známy.

Oviduktní tekutina tvoří specifické prostředí pro kapacitaci spermií, oplodnění vajíčka a raný vývoj embrya. Množství sekretované oviduktní tekutiny se mění v průběhu estrálního cyklu samice, k největší produkci dochází v období estru – říje, v období diestru a těhotenství je produkce oviduktní tekutiny minimální<sup>22,23</sup>. Oviduktní tekutina je směs látek z krevního séra a specifických proteinů produkovaných epitelem vejcovodu.

Mezi složky oviduktní tekutiny patří volné aminokyseliny, proteiny, fosfolipidy, růstové faktory, ionty solí a metabolity (glukosa, pyruvát, laktát)<sup>24-27</sup>. Většina proteinů obsažená v oviduktní tekutině jsou sérové albuminy a imunoglobuliny ( $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -globuliny)<sup>28</sup>.

V oviduktní tekutině mnoha druhů savců byly identifikovány specifické oviduktní glykoproteiny (OGP z angl. ovidukt-specific glykoprotein), které jsou závislé na produkci estrogenu a jsou syntetizovány epiteliálními buňkami vejcovodu<sup>29,30</sup>.

Děložní tekutina má podobné složení jako oviduktní tekutina, ale liší se v koncentracích jednotlivých složek. V děložní tekutině byly nalezeny volné aminokyseliny, glukosa, pyruvát. Nejvíce jsou zde zastoupeny sérové proteiny, bylo zaznamenáno i malé množství specifických děložních proteinů. Jedním ze specifických děložních proteinů je blastokin (též uteroglobulin), který byl identifikován u několika druhů savců<sup>27,31</sup>.

## 1.6 Antimikrobiální aktivita

Reprodukční trakt samic je místem vývoje plodu od setkání gamet do porodu. Pro úspěšný vývoj, narození zdravého jedince a zachování plodnosti je důležitá sterilita prostředí, která je zajištěna vrozenou imunitou proti patogenním mikroorganismům. K největšímu narušení sterility prostředí může dojít při inseminaci a při porodu.

Na ochraně organismu proti širokému spektru patogenních mikroorganismů se podílí celá řada antimikrobiálních proteinů a peptidů jako jsou defensiny ( $\alpha$ - a  $\beta$ -defensin) a katelicidiny<sup>32</sup>. Ve vaječnících a vejcovodech slepic byla prokázána přítomnost histonů H1 a H2B s antimikrobiální aktivitou<sup>33</sup>. V lidské placentě byly identifikovány histony H2A a H2B, u kterých byla prokázána antimikrobiální i endotoxin-neutralizační aktivita<sup>34</sup>. Histony s antimikrobiální aktivitou byly objeveny i v oviduktní tekutině krávy. Jednalo se o histony H4, H2A typ 2-C, H2B typ 1-K a histon H3.3<sup>35</sup>.

## 1.7 Cíl práce

Hlavním cílem mé práce bylo optimalizovat metodu stanovení antimikrobiální aktivity na růstových křivkách buněčných kultur *Escherichia coli* (serotyp K-12). Dále byla stanovována možná antimikrobiální aktivita tekutin izolovaných z reprodukčních traktů dvou hospodářských zvířat, prasnice a krávy. V neposlední řadě byla věnována pozornost závislosti inhibice růstu buněk *E. coli*, způsobená proteiny tekutin reprodukčního traktu, na množství buněk *E. coli* aplikovaných do buněčné kultury.



## 2 Materiál a metody

### 2.1 Použitý materiál

#### 2.1.1 Chemikálie

Ethanol	Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhličitan amonný	Penta, Chrudim, ČR
LBA medium	Dar (laboratoř č. 216 na katedře biochemie PřF UK)
Sérový albumin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

#### 2.1.2 Biologický materiál

Reprodukční trakty krávy	Jatky Plzeň, a.s.
Reprodukční trakty prasnice	Jatky Český Brod, a.s.
Buňky kmene <i>Escherichia coli</i> (serotyp K-12)	Dar (laboratoř č. 216 na katedře biochemie PřF UK)

#### 2.1.3 Další materiál

Mikrotitrační destička	NUNC, Dánsko
------------------------	--------------

## 2.2 Metody

### 2.2.1 Izolace ovidukální tekutiny krávy a prasnice

Z reprodukčních traktů prasnice a krávy byly odděleny ovidukty od rohu dělohy a vaječníku. Promytím oviduktů 0,2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pomocí injekční stříkačky byla získána ovidukální tekutina, která byla jímána do kádinky. Získaná tekutina byla prolita přes síto (200  $\mu\text{m}$ ) a dialyzována proti destilované vodě při teplotě 4°C. Dialyzovaný roztok byl zmražen a lyofilizován.

### 2.2.2 Izolace folikulární tekutiny krávy a prasnice

Vaječníky prasnic a krav byly omyty destilovanou vodou a ze zralých folikulů, o velikosti 0,5 cm a větší, byla injekční stříkačkou odsáta folikulární tekutina. Tekutina získaná z dělohy prasnice byla prolita přes síto (200  $\mu\text{m}$ ) a dialyzována proti destilované vodě při teplotě 4 °C. Dialyzovaná tekutina byla zmražena. Jímaná tekutina z dělohy krávy byla prolita přes síto (200  $\mu\text{m}$ ) a dialyzována proti destilované vodě při 4 °C, zmražena a lyofilizována.

### **2.2.3 Izolace děložní tekutiny krávy a prasnice**

Děložní tekutiny krávy a prasnice byly získány promytím děloh 0,2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Tekutina byla jímána do kádinky, prolita přes síto (200  $\mu\text{m}$ ) a dialyzována při teplotě 4°C proti destilované vodě. Dialyzovaný roztok byl zmražen a lyofilizován.

### **2.2.4 Optimalizace metody stanovení antimikrobiální aktivity na růstových křivkách buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12)**

#### **2.2.4.1 Příprava vzorku zkoumané tekutiny**

Nanášený vzorek zkoumané tekutiny byl připraven rozpuštěním lyofilizované tekutiny - oviduktální, folikulární a děložní tekutiny prasnice nebo krávy (získané dle kap. 2.2.1 – 2.2.3, str. 17,18) v LBA mediu tak, aby koncentrace byla 100 mg/ml. Zmražená folikulární tekutina prasnice byla rozmrazena a 100  $\mu\text{l}$  bylo použito jako vzorek pro stanovení antimikrobiální aktivity.

#### **2.2.4.2 Postup 1**

Do jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku sérového albuminu v LBA mediu o koncentraci 1 mg/ml. Do první jamky sloupce (jamka s nejvyšší koncentrací vzorku) bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku vzorku zkoumané tekutiny (připravený dle kap. 2.2.4.1, str. 18). 100  $\mu\text{l}$  roztoku bylo postupně přeneseno z první jamky do druhé, z druhé do třetí atd. Do poslední jamky nebyl přenesen roztok vzorku, protože sloužila jako kontrolní pro růst buněk *E. coli*. 1 ml buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12), s absorbancí 0,5 při 405 nm proti čistému LBA mediu, byl centrifugován, vzniklá peleta byla rozmíchána v 1 ml LBA media a zmrazena. Pro měření byla rozmrazena, centrifugována a vzniklá peleta buněk naředěna v 1 ml LBA media. Do všech jamek bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12). Výsledné koncentrace zkoumané tekutiny v jamkách sestupně byla 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 a 0 mg/ml.

Mikrotitrační destička byla inkubována v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C a každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm na přístroji Sunrise (firma Tecan), dokud absorbance v kontrolní jamce nebyla vyšší než 0,9.

Stanovení antimikrobiální aktivity vybrané tekutiny bylo provedeno paralelně ve dvou měřeních.

Po několika měřeních byla metoda optimalizována. Mikrotitrační destička byla po aplikaci roztoků umístěna do termostatu a inkubována při teplotě 37 °C po dobu asi 6 hodin.

Přes noc byla destička umístěna v lednici při teplotě 4 °C. Následující den byla každou hodinu měřena absorbance roztoků při 405 nm, dokud hodnota absorbance v poslední jamce nebyla vyšší než 0,9. Mezi měřeními byla mikrotitrační destička umístěna v termostatu (Gallenkamp) při teplotě 37 °C.

Pro lepší informaci o počtu (množství) aplikovaných buněk *E. coli* (serotyp K-12) byla metoda stanovení antimikrobiální aktivity optimalizována.

#### **2.2.4.3 Postup 2**

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 µl roztoku sérového albuminu v LBA mediu o koncentraci 1 mg/ml. Do první jamky sloupce bylo aplikováno 100 µl vzorku zkoumané tekutiny (připravený dle kap. 2.2.4.1, str. 18). Do následujících jamek byl vzorek z první jamky přenesen dvojkovou ředící řadou. Poslední jamka sloupce byla ponechána bez vzorku zkoumané tekutiny. Buněčná kultura *Escherichia coli* (serotyp K-12) byla uchována při teplotě 4 °C, před zředěním na požadovanou absorbanci byla ponechána asi 30 minut při laboratorní teplotě. LBA medium bylo uchováváno v lednici při teplotě 4 °C. Do všech jamek bylo přidáno 100 µl roztoku buněk *E. coli* v LBA mediu s absorbancí při 405 nm přibližně 0,1 proti čistému LBA mediu (měřeno na Helios γ). Výsledné koncentrace zkoumané tekutiny v jednotlivých jamkách sestupně byly 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 a 0 mg/ml.

Mikrotitrační destička byla umístěna v termostatu (firma Gallenkamp) a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin. Každou hodinu byly na přístroji Sunrise (firma Tecan) měřeny absorbance při 405 nm. Přes noc byla destička umístěna v lednici při 4 °C, následující den pokračovalo měření absorbance při 405 nm, dokud absorbance v poslední jamce nebyla vyšší než 0,9. Mezi měřeními byla destička umístěna v termostatu a inkubována při 37 °C.

Stanovení antimikrobiální aktivity vybrané tekutiny bylo provedeno paralelně ve dvou měřeních.

V důsledku chladového šoku začaly buňky *E. coli* růst až následující den od aplikace na mikrotitrační destičku. Z tohoto důvodu byly změněny podmínky kultivace buněk *E. coli* a před ředěním buněk na požadovanou absorbanci bylo LBA medium vytemperováno na 37 °C.

#### 2.2.4.4 Postup 3

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 µl roztoku sérového albuminu v LBA mediu o koncentraci 1 mg/ml. Do první jamky sloupce bylo aplikováno 100 µl vzorku zkoumané tekutiny (připraveno dle kap. 2.2.4.1, str. 18). Vytvořením dvojkové ředící řady byl vzorek přenesen do následujících jamek s postupně snižující se koncentrací. Do poslední (kontrolní) jamky nebyl vzorek přenesen. Buňky *E. coli* (serotyp K-12) byly den před měřením nasazeny a kultivovány v termostatu (firma Gallenkamp) při 37 °C. LBA medium bylo v termostatu vytemperováno na 37 °C. Byl připraven roztok buněk *E. coli* v LBA mediu s absorbancí při 405 nm přibližně 0,1 (měřeno na přístroji Helios γ). Do všech jamek bylo přidáno 100 µl roztoku buněk *E. coli*. Výsledné koncentrace zkoumané tekutiny v jamkách sestupně byly 25; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 a 0 mg/ml.

Každou hodinu byla na přístroji Sunrise (firma Tecan) měřena absorbance roztoků v jamkách při 405 nm, dokud absorbance v kontrolních jamkách nebyla větší jak 0,9. Mezi měřeními byla destička umístěna na třepačce v termostatu při teplotě 37 °C.

Stanovení antimikrobiální aktivity vybrané tekutiny bylo provedeno paralelně ve dvou měřeních.

#### 2.2.5 Stanovení závislosti inhibice oviduktální tekutiny na množství buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12)

Do jamek mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100 µl roztoku oviduktální tekutiny krávy v LBA mediu s koncentrací 25 mg/ml. Den před měřením byly buňky *Escherichia coli* kultivovány a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C. LBA medium bylo vytemperováno na teplotu 37 °C. Byl připraven roztok buněk *E. coli* a absorbancí proti čistému LBA mediu přibližně 0,2 (měřeno na Helios γ). Do první jamky bylo aplikováno 100 µl roztoku buněk a dvojnásobnou ředící řadou byly buňky *E. coli* přeneseny do dalších jamek, kromě poslední. Do poslední jamky bylo aplikováno 100 µl čistého LBA media a slouží jako vzorek pro sledování barevné změny (změny absorbance) samotného proteinu oviduktální tekutiny. Výsledná koncentrace proteinů oviduktální tekutiny ve všech jamkách mikrotitrační destičky byla 12,5 mg/ml.

Byla změřena absorbance roztoků při 405 nm (Sunrise, firma Tecan) a každou hodinu bylo měření opakováno. Mezi měřeními byla mikrotitrační destička s roztoky inkubována v termostatu při teplotě 37 °C. Mikrotitrační destička byla v termostatu umístěna na třepačce při rychlosti 400/min.

### **3 Výsledky**

#### **3.1 Izolace oviduktní tekutiny krávy a prasnice**

Promytím oviduktů krávy a prasnice 0,2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  byly získány oviduktní tekutiny. Jímané tekutiny byly dialyzovány proti destilované vodě při 4 °C, zmrazeny a lyofilizovány. Bylo získáno asi 100 mg lyofilizované oviduktní tekutiny prasnice i krávy. Lyofilizované tekutiny byly dále použity pro stanovení antimikrobiální aktivity oviduktní tekutiny krávy a prasnice.

#### **3.2 Izolace folikulární tekutiny krávy a prasnice**

Folikulární tekutiny vysáté ze zralých folikulů, o velikosti 0,5 cm a větší, byly dialyzovány proti destilované vodě při 4 °C, zmrazeny. Bylo získáno 40 vzorků folikulární tekutiny prasnice po 1 ml. Folikulární tekutiny krávy bylo získáno asi 120 mg. Takto připravené tekutiny byly použity pro stanovení antimikrobiální aktivity folikulárních tekutin krávy a prasnice.

#### **3.3 Izolace děložní tekutiny krávy a prasnice**

Děložní tekutiny získané promytím dělohy krávy a prasnice 0,2M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  byly dialyzovány proti destilované vodě při 4 °C, zmrazeny a lyofilizovány. Touto metodou bylo získáno 150 mg lyofilizovaných tekutin prasnice a krávy. Z lyofilizovaných tekutin dělohy krávy a prasnice byly připraveny vzorky pro stanovení antimikrobiální aktivity.

#### **3.4 Stanovení antimikrobiální aktivity na růstu buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12)**

Metoda stanovení antimikrobiální aktivity proteinů vybraných tekutin byla v průběhu měření několikrát upravována. Antimikrobiální aktivita byla testována na růstu buněk *E. coli* (serotyp K-12), které byly pěstovány s různými koncentracemi směsi proteinů vybrané tekutiny. Jako kontrolní vzorek byla použita buněčná kultura *E. coli*, která rostla bez přítomnosti proteinů vybrané tekutiny.

Příprava roztoků s buněčnou kulturou *E. coli* a proteiny tekutin nejprve probíhaly podle Postupu 1 (kap. 2.2.4.2, str. 18). V tomto případě byly buňky *E. coli* v růstové fázi přidány do odpovídajícího množství LBA media a 100  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku bylo aplikováno

do všech jamek mikrotitrační destičky. Pro lepší informovanost o množství (počtu) buněk přidaných k roztokům proteinů vybrané tekutiny byla metoda optimalizována a další měření probíhala podle Postupu 2 (kap. 2.2.4.3, str. 19). Roztok buněk *E. coli* aplikovaný na mikrotitrační destičku byl připraven naředěním buněčné kultury *E. coli*, která byla pěstována v lednici při teplotě 4 °C, v LBA mediu na absorbanci přibližně 0,1 při vlnové délce 405 nm (měřeno na přístroji Helios  $\gamma$ ) proti čistému LBA mediu. LBA medium bylo také vytemperováno na 4 °C. Mikrotitrační destička s roztoky buněk a proteinů tekutin byly inkubovány v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C. Buněčné kultury *E. coli*, připravené dle Postupu 2 (kap. 2.2.4.3, str. 19), v den aplikace na mikrotitrační destičku nerostly, nárůst buněk začal až následující den. Jednodenní pozastavení růstu bylo pravděpodobně způsobeno teplotním šokem. Na základě tohoto zjištění byla provedena úprava podmínek pěstování buněk *E. coli*. Den před zahájením pokusu byly buňky *Escherichia coli* kultivovány v LBA mediu v termostatu (firma Gallenkamp) při 37 °C. Do jamek mikrotitrační destičky byl přidán buněčný roztok připravený naředěním buněk *E. coli*, které byly pěstovány při 37 °C, v LBA mediu vytemperovaném na 37 °C tak, aby absorbance roztoku buněk byla při vlnové délce 405 nm přibližně 0,1 proti čistému LBA mediu (měřeno na Helios  $\gamma$ ).

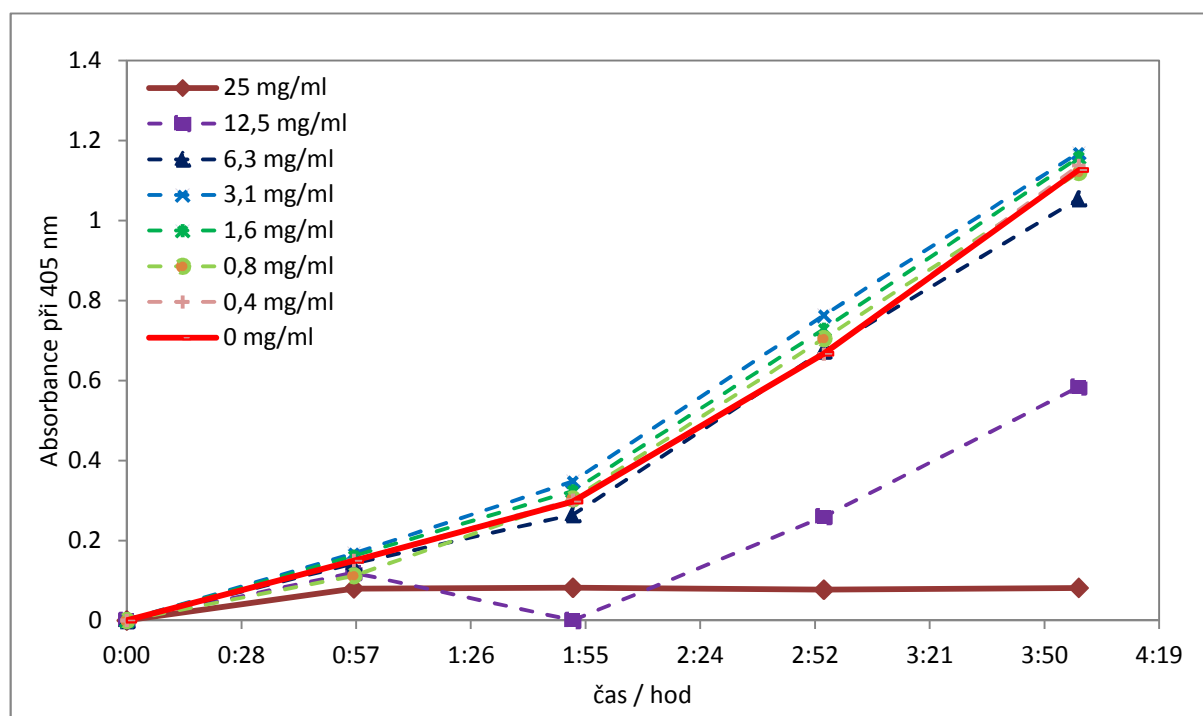
Příprava buněčných kultur *E. coli*, které byly aplikovány do jamek mikrotitrační destičky, pro stanovení antimikrobiální aktivity proteinů vybrané tekutiny probíhala dle Postupu 3 (kap. 2.2.4.4, str. 20).

### **3.4.1 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny prasnice**

Antimikrobiální aktivita byla zkoumána na růstu buněk *Escherichia coli* (K-12). Podle kap. 2.2.4.4 (str. 20) byly připraveny buněčné kultury s různou koncentrací proteinů oviduktální tekutiny. Do jamek mikrotitrační destičky byl aplikován sérový albumin v LBA mediu (1 mg/ml), vzorek oviduktální tekutiny prasnice připravený rozpuštěním lyofilizované oviduktální tekutiny (získané dle kap. 2.2.2, str. 17) v LBA mediu (různé koncentrace) a buňky *E. coli*. V první jamce byla oviduktální tekutiny prasnice 25 mg/ml a v následujících jamkách byla koncentrace vždy poloviční. Do poslední (kontrolní) jamky nebyl vzorek oviduktální tekutiny přidán, koncentrace tedy byla 0 mg/ml.

Mikrotitrační destička s roztoky byla inkubována v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm na přístroji Sunrise (firma Tecan), dokud absorbance v kontrolní jamce nebyla větší než 0,9.

Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti absorpance na čase Obr. 4.



**Obr. 4: Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny prasnice na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12).** Koncentrace proteinů oviduktální tekutiny jsou uvedeny v legendě. Každou hodinu byla měřena absorpance roztoků při 405 nm, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Na růstových křivkách buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12) pozorujeme téměř úplnou inhibici růstu při nejvyšší koncentraci (25 mg/ml) proteinů oviduktální tekutiny. Při koncentraci proteinů 12,5 mg/ml je stále viditelná silná inhibice růstu buněk *E. coli*. Při nižších koncentracích proteinů oviduktální tekutiny (6,3 mg/ml a nižší) mají růstové křivky podobný průběh jako růstová křivka buněk *E. coli* rostoucích bez přítomnosti proteinů oviduktální tekutiny prasnice v kontrolní jamce. Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny prasnice je prokazatelná při koncentracích proteinů 12,5 mg/ml a vyšších.

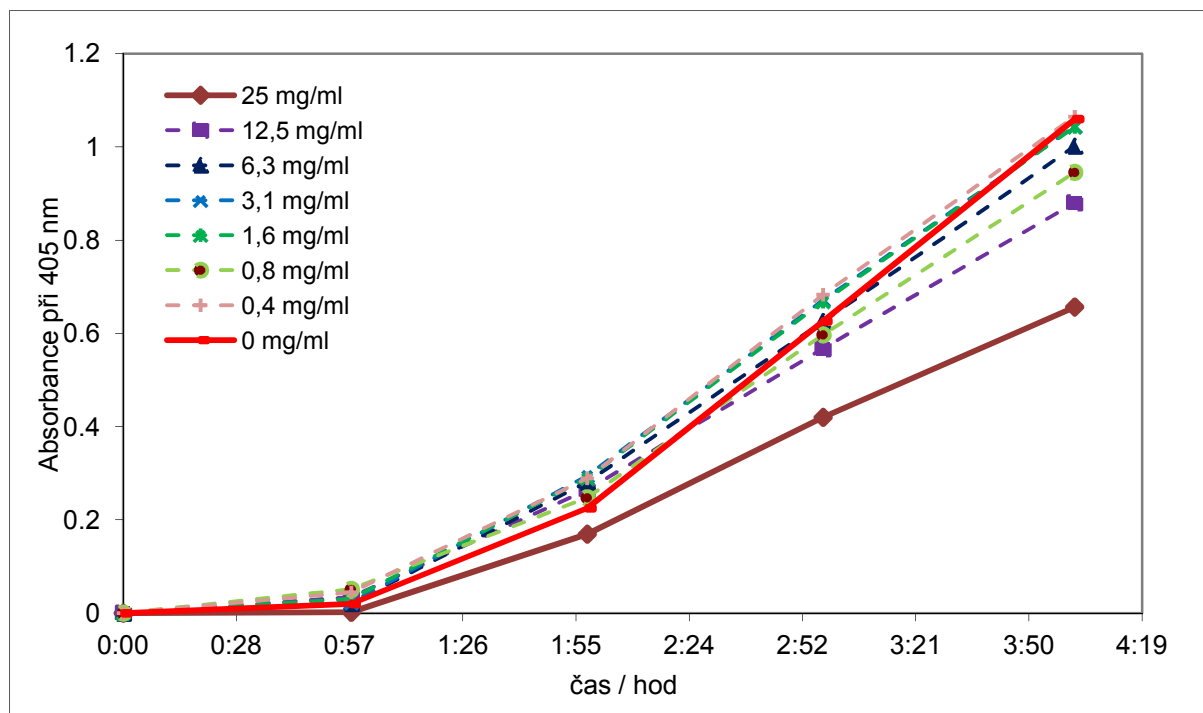
### 3.4.2 Antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny krávy

Na růstových křivkách buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12) byla zkoumána antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny krávy (získané dle kap. 2.2.2, str.17). Do jamek mikrotitrační destičky byl aplikován sérový albumin v LBA mediu (1 mg/ml), vzorek oviduktální tekutiny krávy připravený rozpuštěním lyofilizované oviduktální tekutiny v LBA mediu (různé koncentrace) a buňky *E. coli*. V první jamce byla koncentrace oviduktální tekutiny 25 mg/ml a v následujících jamkách byla koncentrace vždy poloviční. Do poslední

(kontrolní) jamky nebyl vzorek oviduktální tekutiny krávy přidán, koncentrace tedy byla 0 mg/ml.

Mikrotitrační destička byla inkubována v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm na přístroji Sunrise (firma Tecan), dokud absorbance v kontrolní jamce nebyla větší než 0,9.

Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti absorbance na čase.



**Obr. 5: Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů oviduktální tekutiny krávy na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12).** Koncentrace proteinů oviduktální tekutiny jsou uvedeny v legendě. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Na Obr. 5 je graf s růstovými křivkami buněk *E. coli*. Inhibice růstu je patrná jen u nejvyšší koncentrace proteinů oviduktální tekutiny. Při nižších koncentracích proteinů pokles růstu buněk *E. coli* nepozorujeme. Antimikrobiální aktivita se projevuje při koncentracích proteinů oviduktální tekutiny krávy 25 mg/ml a vyšších.

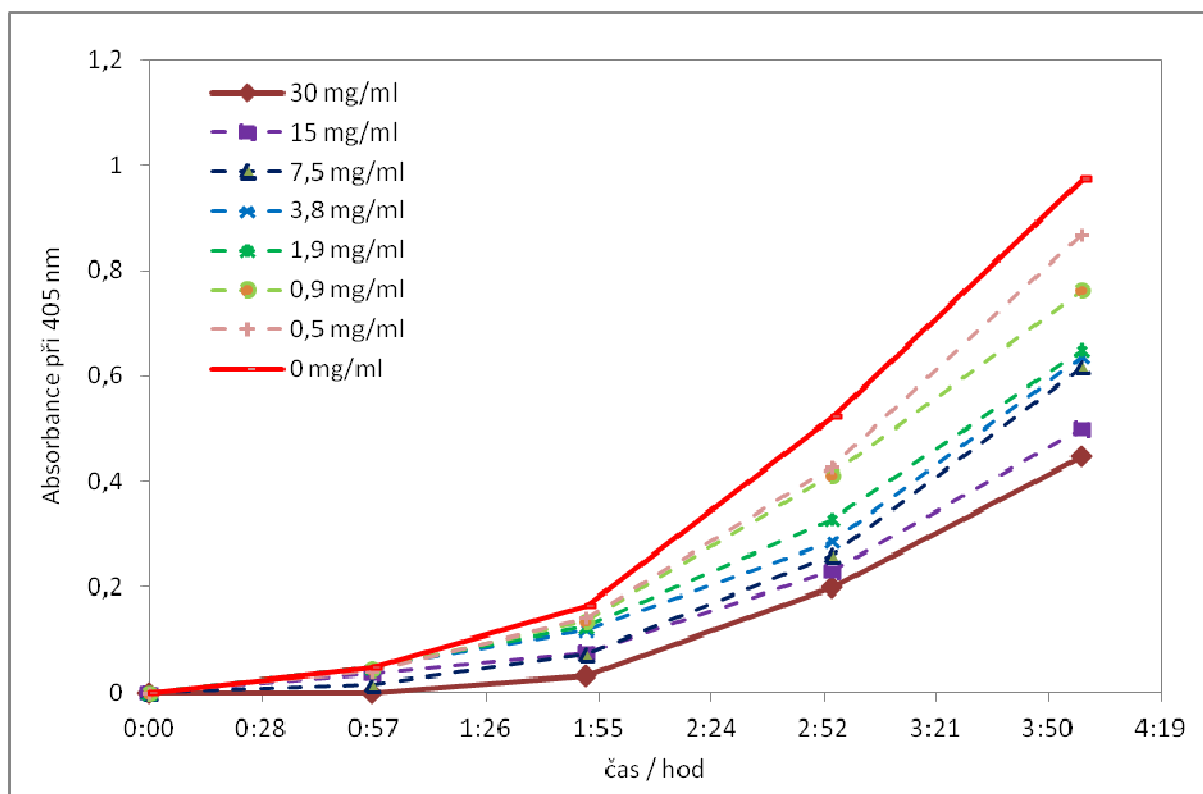
### 3.4.3 Antimikrobiální aktivita folikulární tekutiny prasnice

Folikulární tekutina prasnice v různých koncentracích byla přidána do roztoku buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12). Na růstových křivkách těchto buněk byla stanovována antimikrobiální aktivita folikulární tekutiny prasnice.



Do jamek mikrotitrační destičky byl aplikován roztok sérového albuminu, vzorek folikulární tekutiny prasnice v různých koncentracích a roztok buněk *E. coli* podle kap. 2.2.4.4, str. 20). Buněčné kultury byly inkubovány v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm na přístroji Sunrise (firma Tecan), dokud absorbance v kontrolní jamce nebyla větší než 0,9.

Z naměřených hodnot byl sestaven graf závislosti absorbance na čase Obr. 6.



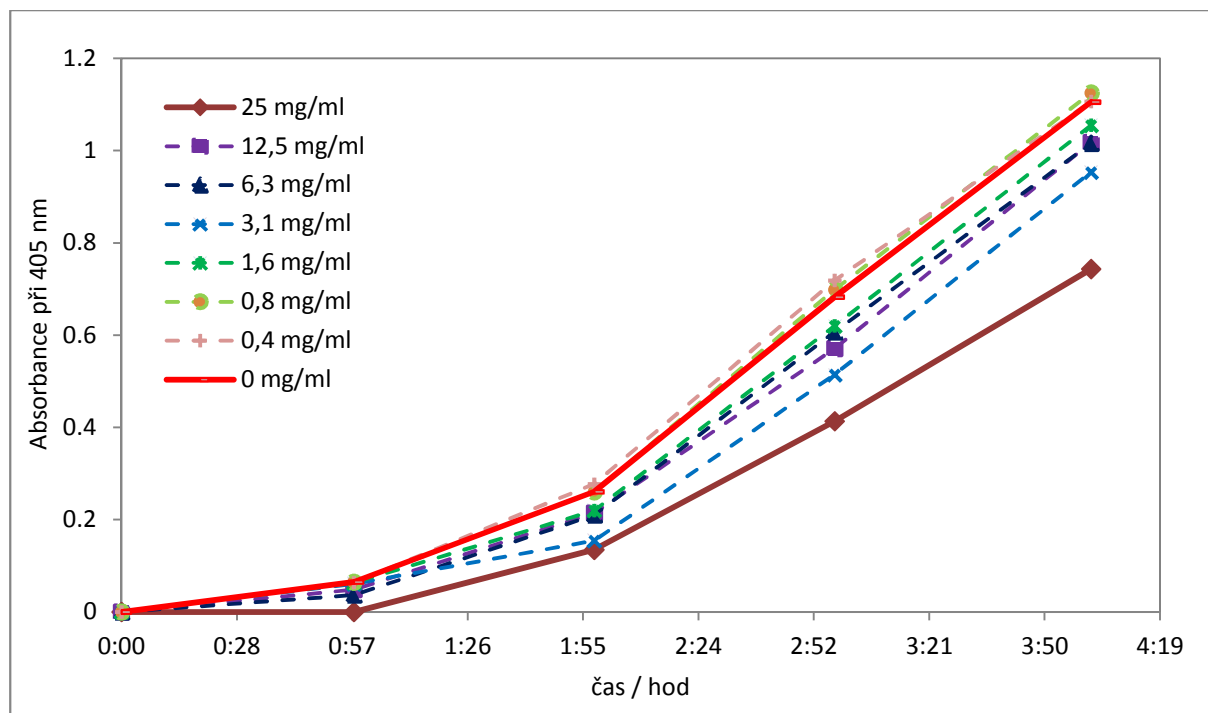
**Obr. 6: Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů folikulární tekutiny prasnice** na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp). Koncentrace proteinů folikulární tekutiny jsou uvedeny v legendě. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Při pohledu na růstové křivky buněk *E. coli* s různými koncentracemi směsi proteinů folikulární tekutiny prasnice je u všech koncentrací vidět potlačení růstu oproti buněčné kultuře *E. coli* bez proteinů folikulární tekutiny (červená křivka). Se zvyšující se koncentrací proteinů folikulární tekutiny v buněčné kultuře je potlačení růstu buněk *E. coli* větší. Největší inhibice růstu byla zjištěna u nejvyšší koncentrace proteinů folikulární tekutiny prasnice.

### 3.4.4 Antimikrobiální aktivita folikulární tekutiny krávy

Lyofilizovaná folikulární tekutina krávy (získaná dle kap. 2.2.3, str. 18) byla rozpuštěna v LBA mediu a v různých koncentracích přidána do roztoku buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12) (dle kap. 2.2.4.4, str. 21). Buněčné kultury byly inkubovány v termostatu (firma Gallenkamp) při teplotě 37 °C. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm na přístroji Sunrise (firma Tecan), dokud absorbance v kontrolní jamce nebyla větší než 0,9.

Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti absorbance na čase Obr. 7. Růstové křivky buněk *E. coli* byly použity pro stanovení antimikrobiální aktivity folikulární tekutiny krávy.



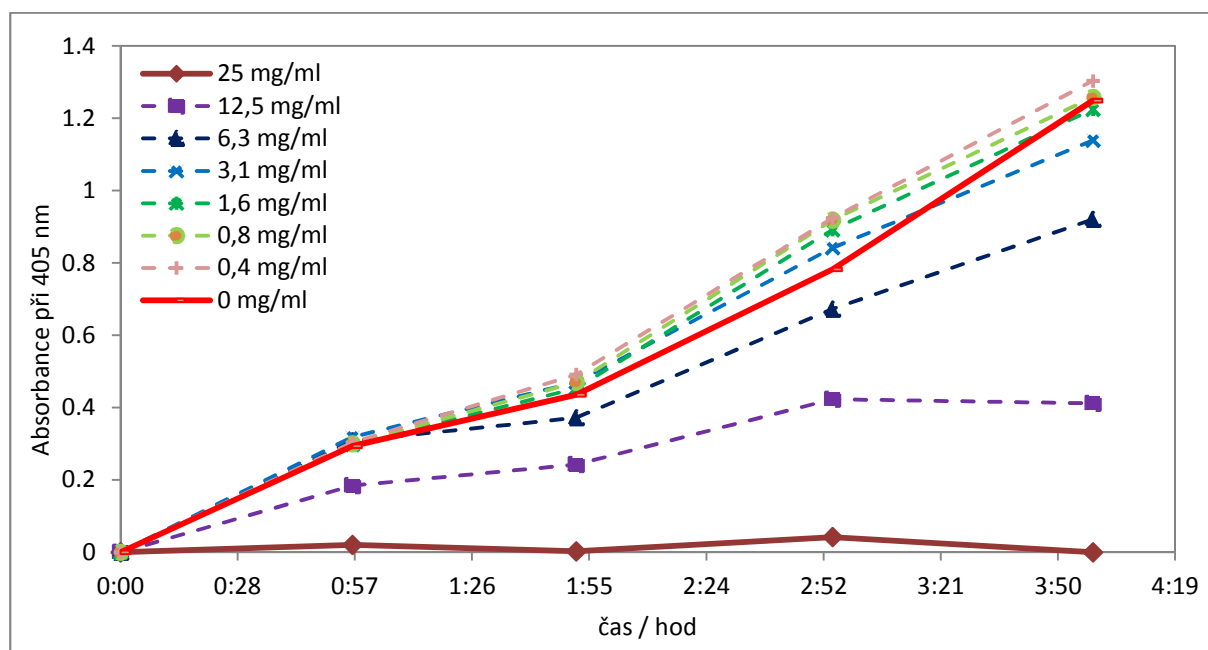
**Obr. 7:** Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů folikulární tekutiny krávy na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12). Koncentrace proteinů folikulární tekutiny jsou uvedeny v legendě. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Na Obr. 7 vidíme mírné potlačení růstu buněk *E. coli*, které byly kultivovány se směsí proteinů folikulární tekutiny s koncentrací 25 mg/ml. Antimikrobiální aktivita směsi proteinů folikulární tekutiny krávy s koncentracemi 12,5 mg/ml a nižší není zcela prokazatelná, protože růstové křivky těchto buněčných kultur jsou velice podobné růstové křivce buněk *E. coli* rostoucích bez proteinů folikulární tekutiny.

### 3.4.5 Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny prasnice

Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů děložní tekutiny bylo provedeno na růstových křivkách buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12). Na mikrotitrační destičku byly připraveny buněčné kultury *E. coli* s různou koncentrací proteinů děložní tekutiny dle kap. 2.2.4.4, str. 20. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm (na přístroji Sunrise, firma Tecan). Mezi měřeními byla mikrotitrační destička inkubována v termostatu při teplotě 37 °C.

Z naměřených hodnot byl vytvořen graf závislosti absorbance na čase Obr. 8.



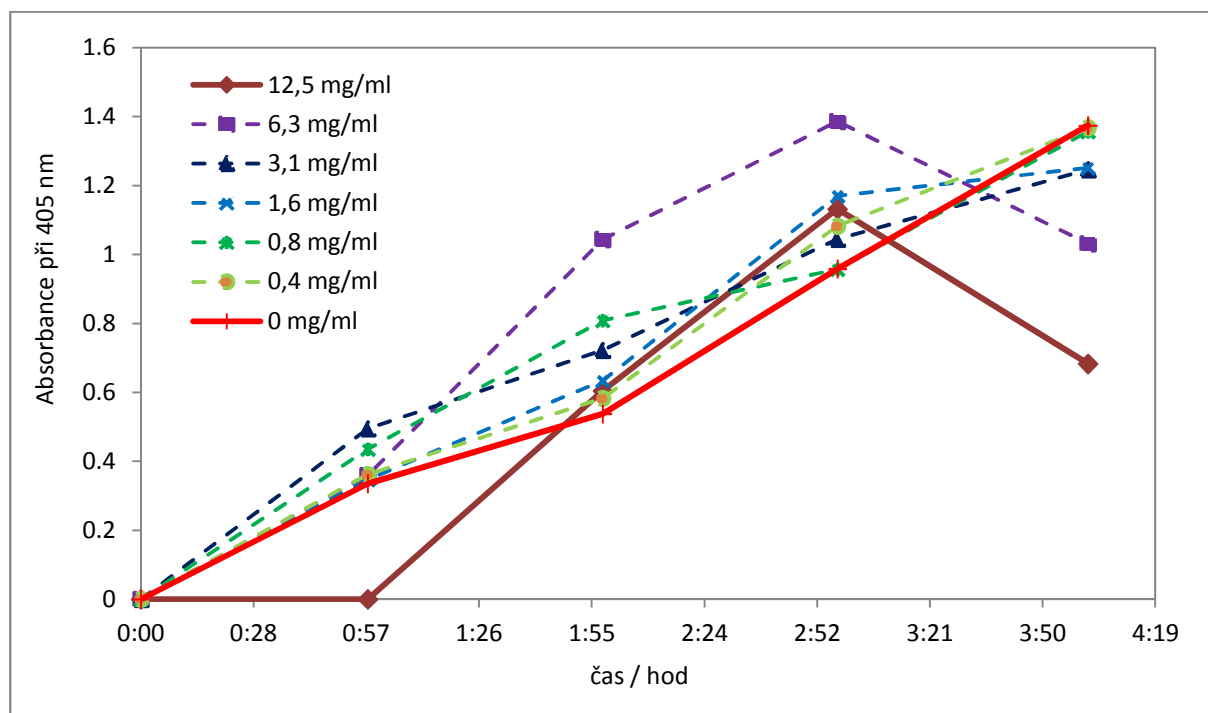
**Obr. 8:** Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů děložní tekutiny prasnice na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12). Koncentrace proteinů ovidukální tekutiny jsou uvedeny v legendě. Absorbance roztoků při 405 nm byly měřeny každou hodinu, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Z grafu na Obr. 8 můžeme usoudit, že směs proteinů děložní tekutiny prasnice inhibuje růst buněk *E. coli* při koncentracích proteinů 25 mg/ml a 12,5 mg/ml. Při nižších koncentracích proteinů není pozorováno výrazné potlačení růstu buněk *E. coli*. Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny prasnice je prokazatelná pro koncentrace proteinů děložní tekutiny prasnice 12,5 mg/ml a vyšší.

### 3.4.6 Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny krávy

Buněčné kultury *E. coli* (serotyp K-12) s různou koncentrací proteinů děložní tekutiny krávy byly připraveny dle kap. 2.2.4.4, str. 20 a inkubovány v termostatu (firma Gallenkamp) při 37 °C. Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm (na přístroji Sunrise, firma Tecan).

Z naměřených hodnot absorbance byl vytvořen graf závislosti absorbance při 405 nm na čase Obr. 9.



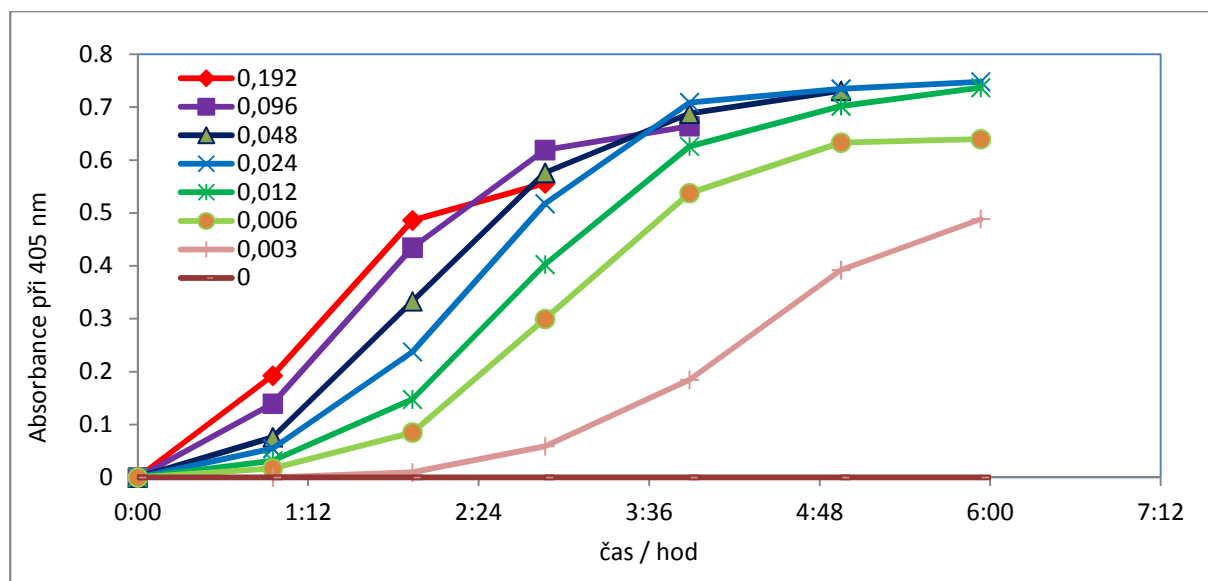
**Obr. 9: Stanovení antimikrobiální aktivity proteinů děložní tekutiny krávy na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12).** Koncentrace proteinů ovidukální tekutiny jsou uvedeny v legendě. Absorbance roztoků při 405 nm byly měřeny každou hodinu, mezi měřeními byly buněčné kultury inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C.

Antimikrobiální aktivita proteinů děložní tekutiny nebyla při měření prokázána. Na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12) (zejména při 12,5 mg/ml a 6,3 mg/ml) jsou vidět skoky, což mohlo být způsobeno charakteristikou děložní tekutiny. Roztok děložní tekutiny krávy aplikovaný do jamek mikrotitrační destičky byl červenohnědý, zakalený a velice viskózní. V průběhu měření se barva roztoku postupně změnila na světle žlutou.

### 3.5 Stanovení závislosti inhibice proteinů ovidukální tekutiny na množství buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12)

Pro zjištění závislosti mezi inhibicí růstu buněk *E. coli* (serotyp K-12) směsí proteinů ovidukální tekutiny a množstvím (počtem) buněk *E. coli* aplikovaných do jamek mikrotitrační destičky bylo provedeno měření dle kap. 2.2.5, str. 20. V jamkách mikrotitrační destičky bylo konstantní množství proteinů ovidukální tekutiny krávy a různá množství buněk *Escherichia coli*. Do první jamky byl aplikován roztok buněk s absorbancí při vlnové délce 405 nm přibližně 0,2 proti čistému LBA mediu (měřeno na Helios  $\gamma$ ). Do dalších jamek byly buňky rozneseny dvojkovou ředící řadou, kromě poslední jamky.

Každou hodinu byla měřena absorbance roztoků při 405 nm (na přístroji Sunrise, firma Tecan). Měření bylo ukončeno, když se buněčné kultury *E. coli* dostaly do stacionární fáze růstu. Mezi měřeními byly buněčné kultury pěstovány v termostatu při teplotě 37 °C na třepačce při rychlosti třepání 400/min. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf na Obr. 10.



**Obr. 10: Rychlost nárůstu různého množství buněk *E. coli* (typ) s konstantním množstvím proteinů ovidukální tekutiny krávy.** V legendě jsou uvedeny absorbance roztoků buněk *E. coli* (serotyp K-12), přidaných do jamek mikrotitrační destičky, při 405 nm proti čistému LBA mediu. Mikrotitrační destička s buněčnými kulturami byla inkubována v termostatu při 37 °C a třepána při rychlosti 400/min. Každou hodinu byla měřena absorbance při 405 nm, dokud buňky nedosáhly stacionární fáze růstu.

Na růstových křivkách buněk *E. coli*, které byly kultivovány s konstantní koncentrací proteinů ovidukální tekutiny, je vidět zpožděný růst buněčných kultur, do kterých bylo aplikováno menší množství buněk *E. coli*. Čím menší je množství aplikovaných buněk,

tím delší dobu trval nárůst buněk do stacionární fáze. Při menším počtu aplikovaných buněk do buněčné kultury, pěstované s proteiny ovidukální tekutiny, je potlačení růstu větší.

### 3.6 Biologické aspekty výsledků

Při stanovování antimikrobiální aktivity bylo zjištěno různě velké potlačení růstu buněk *E. coli* (serotyp K-12) pěstovaných s proteiny tekutin získaných z oviduktů, folikulů a děloh prasnice a krávy. Pro vyjádření stupně inhibice bylo použito koncentrace, při které je potlačení růstu buněk *E. coli* proteiny vybrané tekutiny právě poloviční ( $IC_{50}$ ).

**Tab. 1: Antimikrobiální aktivita jednotlivých tekutin a její porovnání s koncentracemi proteinů v přirozeném prostředí.**

V tabulce jsou uvedeny koncentrace proteinů jednotlivých tekutin v jejich přirozeném prostředí. Antimikrobiální aktivita je zde vyjádřena v koncentracích proteinů, které potlačí růst právě polovině buněk *E. coli* (serotyp K-12). V posledním sloupci je uvedeno ředění, při kterém vybraná tekutina inhibuje růst buněk *E. coli* právě z poloviny.

zvíře	typ tekutiny	koncentrace proteinu v přirozeném prostředí *	antimikrobiální aktivita $IC_{50}$	$IC_{50} \approx$ ředění
prase	ovidukální	60 - 70 mg/ml	10 mg/ml	1:6
	folikulární	124 mg/ml	30 mg/ml	1:4
	děložní	40 - 48 mg/ml	14 mg/ml	1:3
kráva	ovidukální	80 mg/ml	34 mg/ml	1:2
	folikulární	126 mg/ml	30 mg/ml	1:4
	děložní	30 - 45 mg/ml	N	N
kůň	ovidukální	85 - 90 mg/ml	24 mg/ml**	1:4
	folikulární	120 mg/ml	32 mg/ml**	1:3,5

\* - koncentrace proteinů změřeny metodou Bradfordové

\*\* - změřeno v VÚVeL Brno

N – nezměřeno (hodnoty nejsou k dispozici)

## 4 Diskuze

Reprodukce je víceetapový přesně řízený proces zahrnující děje jako setkání gamet, jejich splynutí ve vejcovodu, transport embrya do dělohy, nidaci a vývoj plodu v děloze až do porodu. Celý reprodukční trakt je imunologicky supresovaná tkáň, v níž je ovšem nutné udržet minimální množství patogenů.

Ve své práci jsem se zabývala optimalizací metody a stanovením antimikrobiální aktivity tekutin reprodukčního traktu. Předpokládala jsem, že tekutiny vnitřních orgánů reprodukčního traktu obsahují buněčné komponenty a proteiny, které vykazují antimikrobiální aktivitu, stejně jako v případě slepičího reprodukčního traktu<sup>33</sup>, hovězí ovidukální tekutiny<sup>35</sup> a lidské dělohy<sup>34</sup>. Izolovala jsem tekutiny ze zralých folikulů vaječníků, vejcovodů a děloh. Pro testování jsem zvolila dvě hospodářská zvířata – prasnice a krávy. Získané tekutiny byly použity jako vzorky pro stanovení antimikrobiální aktivity.

Stanovení antimikrobiální aktivity probíhalo na růstových křivkách buněčných kultur *Escherichia coli* (serotyp K-12), které byly pěstovány s různými koncentracemi proteinů izolovaných tekutin. *Escherichia coli* je gram-negativní bakterie, která je součástí přirozené střevní mikroflóry. V patologických případech se může vyskytovat i v reprodukčním traktu. Pro mé pokusy byla bakterie *E. coli* (serotyp K-12) zvolena pro její rychlý růst.

Metoda stanovení antimikrobiální aktivity je založena na porovnání růstových křivek buněk *E. coli* (serotyp K-12), které jsou kultivovány s proteiny tekutin izolovaných z reprodukčního traktu prasnice nebo krávy, proti růstu buněk *E. coli* jen v kultivačním mediu. Buněčné kultury v mikrotitračních destičkách byly kultivovány v termostatu při 37 °C a každou hodinu byly měřeny absorbance při vlnové délce 405 nm. Vlnová délka 405 nm byla zvolena z důvodu žlutohnědého zabarvení vzorků tekutin reprodukčního traktu. Během měření jsem zjistila, že pokud byl buněčný roztok připraven z buněk *E. coli* kultivovaných při 4 °C a z LBA media o stejné teplotě, buněčné kultury v mikrotitračních jamkách začaly růst až následující den. Předpokládala jsem, že jednodenní zastavení růstu bylo způsobeno teplotním šokem. Pro další měření byl roztok buněk *E. coli* aplikovaný na mikrotitrační destičku připraven z buněk *E. coli* kultivovaných v termostatu při 37 °C den před měřením a z LBA media vytemperovaného také na 37 °C. Při těchto podmínkách dosáhly buněčné kultury *E. coli* v kontrolních jamkách exponenciální fáze růstu už několik hodin od počátku měření.

Z výsledků mého měření vyplývá, že tekutiny získané z reprodukčních traktů prasnice a krávy (kromě děložní tekutiny krávy) potlačují růst buněk *E. coli* (serotyp K-12). Inhibice

růstu buněk *E. coli*, a tedy i antimikrobiální aktivita, byly dokázány při koncentracích proteinů, které jsou menší než fyziologické. Na základě těchto zjištění předpokládám, že proteiny tekutin reprodukčního traktu vykazující antimikrobiální aktivitu jsou součástí ochrany reprodukčního traktu před patogenními mikroorganismy.

Ve své práci jsem se také věnovala zjištění závislosti mezi stupněm potlačení růstu buněčných kultur ovidukální tekutinou krávy a množstvím buněk *Escherichia coli* (serotyp K-12) aplikovaných do mikrotitračních jamek. Z výsledků vyplývá, že čím menší je množství (počet) aplikovaných buněk *E. coli* do buněčných kultur, které jsou pěstovány s konstantním množstvím proteinů ovidukální tekutiny krávy, tím větší je potlačení růstu těchto buněk. Z tohoto měření vyplývá, že vznik infekce v reprodukčním traktu je závislý na koncentraci proteinů vykazujících antimikrobiální aktivitu, ale i na množství přítomných patogenních mikroorganismů.

Studium proteinů a buněčných komponentů zajišťujících a udržujících aseptické prostředí v reprodukčním traktu považuji za důležité pro pochopení dějů vedoucích k aborci či infertilitě.



## 5 Souhrn výsledků

- Oviduktální tekutina byla izolována z vaječníků prasnice a krávy, zmražena a lyofilizována. Z lyofilizované tekutiny byly připraveny vzorky pro stanovení antimikrobiální aktivity.
- Ze zralých folikulů, o velikosti 0,5 cm a větších, prasnice a krávy byla injekční stříkačkou odebrána folikulární tekutina. Získaná folikulární tekutina krávy byla zmražena a lyofilizována. Folikulární tekutina prasnice byla zmražena. Ze získaných tekutin byly připraveny vzorky pro stanovení antimikrobiální tekutiny.
- Z děloh prasnice a krávy byla získána děložní tekutina, která byla zmražena a lyofilizována. Z lyofilizované tekutiny byly připraveny vzorky pro testování antimikrobiální tekutiny.
- Na růstových křivkách buněk *E. coli* (serotyp K-12) byla testována antimikrobiální aktivita různých koncentrací proteinů získaných tekutin.
- Antimikrobiální aktivita byla prokázána u proteinů oviduktální tekutiny při koncentracích 12,5 mg/ml a vyšších.
- Na růstu buněk *E. coli* (serotyp K-12) byla prokázána antimikrobiální aktivita oviduktální tekutiny krávy při koncentraci proteinů oviduktální tekutiny 25 mg/ml.
- Folikulární tekutina prasnice byla testována na možnou antimikrobiální aktivitu na růstu buněk *E. coli*. Se zvyšující se koncentrací proteinů folikulární tekutiny se zvyšovala inhibice růstu buněk *Escherichia coli*. Největší potlačení růstu bylo při nejvyšší a druhé nejvyšší koncentraci folikulární tekutiny prasnice.
- Antimikrobiální tekutina byla testována i u folikulární tekutiny krávy. Bylo zjištěno potlačení růstu buněk *E. coli* při koncentraci proteinů folikulární tekutiny 25 mg/ml.

- Proteiny děložní tekutiny prasnice inhibovaly růst buněk *E. coli* (serotyp K-12). Při nejvyšší koncentraci proteinů (25 mg/ml) byl růst buněk *E. coli* téměř úplně potlačen. Koncentrace proteinů 12,5 mg/ml inhibovala růst buněk asi z poloviny.
- Antimikrobiální aktivita děložní tekutiny krávy nebyla prokázána.
- Byla testována závislost inhibice konstantní koncentrací proteinů ovidukální tekutiny na množství aplikovaných buněk *E. coli* (serotyp K-12). Tento pokus ukázal, že čím menší je množství buněk v buněčné kultuře s proteiny ovidukální tekutiny, tím déle trvá než buňky dosáhnou stacionární fáze růstu. Při menším počtu aplikovaných buněk do testované buněčné kultury je inhibice růstu způsobená proteiny ovidukální tekutiny větší.

## **Použitá literatura**

- 1) Sládeček, F.: Rozmnožování a vývoj živočichů, Academia, Praha (1986)
- 2) Komárek, V., Sova, Z.: Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat, SZN, Praha, (1971)
- 3) Marvan, F.: Morfologie hospodářských zvířat, Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha (2003).
- 4) Najbrt, R.: Veterinární Anatomie 2, SZN, Praha (1982).
- 5) Černý, H.: Veterinární anatomie pro studium a praxi, Noviko, a.s., Brno (2002)
- 6) Cibulka, J., Fučíková, A.: Základy fyziologie hospodářských zvířat, Česká zemědělská univerzita v Praze, (2004)
- 7) Ekhlasi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsolová, M., Petrunkina, A., Töpfer-Petersen, E.: Biol. Reprod. 73, 536-545 (2005)
- 8) Lefebvre, R., Suarez, S.S.: Biol. Reprod. 54, 575–582 (1996)
- 9) Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S.: J. Androl. 19, 242-248 (1998)
- 10) Evans, J.P., Florman, H.M.: Nat. Cel. Biol. 4, 57-63 (2002)
- 11) Bahat, A., Eisenbach, M.: Mol. Cell. Endocrinol. 252, 115–119 (2006)
- 12) Eisenbach, M.: Dev. Genet. 25, 87–94 (1999)
- 13) Zhuo, L., Kimata, K.: Science 196, 189–196 (2001)
- 14) Salustri, A., Yanagishita, M., Hascall, V.C.: J. Biol. Chem. 264, 13840–13847 (1989)
- 15) Wassarman, P.M.: J. Biol. Chem. 283, 24285–9 (2008)
- 16) Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., Primakoff, P.: J. Cell Biol. 125, 1157-1163 (1994)
- 17) Talbot, P., Shur, B.D., Myles, D.G.: Biol. Reprod. 68, 1–9 (2003)
- 18) Bedford, J.M.: Biol. Reprod. 2, 128–58 (1970)
- 19) Talbot, P., Dandekar, P.: Microsc. Res. Techniq. 61, 349–357 (2003)
- 20) Mahajan, D.K., Little, A.B.: Biol. Reprod. 17, 834 – 842 (1978)
- 21) Rodgers, R.J., Irving-Rodgers, H.F.: Biol. Reprod. 82, 1021–9 (2010)
- 22) Roberts, G.P., Parker, J.M., Symonds, H.W.: Reproduction 45, 301–313 (1975)
- 23) Stanke, D.F., DeYoung, D.W., Sikes, J.D., Mather, E.C.: J. Reprod. Fertil. 32, 535–7 (1973)
- 24) Leese, H.: Reproduction 82, 843–856 (1988)
- 25) Aguilar, J., Reyley, M.: Anim. Reprod. Sci. 2, 91–105 (2005)

- 26) Killian, G.J., Chapman, D.A., Kavanaugh, J.F., Deaver, D.R., Wiggin, H.B.:  
Reproduction 86, 419–426 (1989)
- 27) Li, R., Whitworth, K., Lai, L., Wax, D., Spate, L., Murphy, C.N., Rieke, A., Isom, C.,  
Hao, Y., Zhong, Z., Katayama, M., Schatten, H., Prather, R.S.: Mol. Reprod. Dev. 74,  
1228–35 (2007)
- 28) Stanke, D.F., Sikes, J.D., DeYoung, D.W., Tumbleson, M.E.: Reproduction 38,  
493–496 (1974)
- 29) Buhi, W.: Reproduction 123, 355–362 (2002)
- 30) Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Kouba, A.J.: Cells, tissues, organs 166, 165–79 (2000)
- 31) Roberts, G.P., Parker, J.M.: J. Reprod. Fertil. 40, 291–303 (1974)
- 32) Izadpanah, A., Gallo, R.L.: J. Am. Acad. Dermat. 52, 381–90 (2005)
- 33) Silphaduang, U., Hincke, M.T., Nys, Y., Mine, Y.: Biochem. Bioph. Res. Co. 340,  
648–655 (2006)
- 34) Kim, H.S., Cho, J.H., Park, H.W., Yoon, H., Kim, M.S., Kim, S.C.: J. Immunol. 168,  
2356–2364 (2002)
- 35) Kračmerová, J., Dráb, T., Hanzlíková, E., Tichá, M., Příkryl, P., Liberda, J.,:  
*připravováno k publikaci* (2012).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka